

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-024070

(43)Date of publication of application : 28.01.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
A61K 39/395
A61K 45/00
A61P 43/00
C07K 14/705
C07K 16/28
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12P 21/02
C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566

(21)Application number : 2001-169344

(71)Applicant : PHARMA DESIGN INC

(22)Date of filing : 05.06.2001

(72)Inventor : FURUYA TOSHIO
KANAI OSAMU
SAITO TOSHIYUKI
OKAZE HAJIME

(54) NOVEL G PROTEIN-CONJUGATED RECEPTOR TYPE PROTEIN AND GENE OF THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a novel G protein-conjugated type receptor protein and a gene of the same.

SOLUTION: The G protein-conjugated type receptor protein containing an amino acid sequence same as or substantially same as a specific amino acid sequence and a polynucleotide containing a base sequence for coding the above protein are obtained. An antigen to the peptide and a method for analyzing a state of expressing the G protein-conjugated type receptor protein are provided.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2003-24070
(P2003-24070A)

(43) 公開日 平成15年1月28日 (2003.1.28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 39/395			N
		45/00	
45/00		A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 43/00	1 0 5	C 0 7 K 14/705	

審査請求 未請求 請求項の数26 O L (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-169344 (P2001-169344)

(22) 出願日 平成13年6月5日 (2001.6.5)

(71) 出願人 500386563

株式会社ファルマデザイン

東京都中央区八丁堀4-2-10 第二後関ビル3F

(72) 発明者 古谷 利夫

東京都小金井市東町1-11-23

(72) 発明者 金井 理

静岡県沼津市大岡3368-10-307

(72) 発明者 齋藤 俊之

千葉県船橋市宮本2-10-1

(72) 発明者 大風 元

千葉県千葉市稲毛区小仲台3-1-24 ハイツダイボー103

(54) 【発明の名称】 新規なGタンパク質共役型受容体タンパク質及びその遺伝子

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 新規なGタンパク質共役型受容体タンパク質及びその遺伝子の提供。

【解決手段】 特定のアミノ酸配列と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むことを特徴とするGタンパク質共役型受容体タンパク質及び当該タンパク質コードする塩基配列を含むポリヌクレオチドを提供する。さらに、このペプチドに対する抗体や、当該ポリヌクレオチドを用いたGタンパク質共役型受容体タンパク質の発現状態の分析法についても提示する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2で表わされるアミノ酸配列と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むことを特徴とするGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩。

【請求項2】 請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質の部分アミノ酸配列を含むことを特徴とするペプチドまたはその塩。

【請求項3】 請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質又は請求項2記載のペプチドをコードする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

【請求項4】 ポリヌクレオチドがDNAであることを特徴とする請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項5】 配列番号1で表される塩基配列又は該塩基配列の一部を含む請求項3記載のポリヌクレオチド。

【請求項6】 請求項3記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【請求項7】 請求項6記載の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

【請求項8】 請求項7記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質を採取することを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質またはその塩の製造方法。

【請求項9】 請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、あるいは請求項2記載のペプチドまたはその塩に対する抗体。

【請求項10】 抗体が請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質のシグナル伝達を阻害する活性を有するものである請求項9記載の抗体。

【請求項11】 請求項9記載の抗体を有効成分として含有する薬学的組成物。

【請求項12】 請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質に対するリガンド。

【請求項13】 請求項12記載のリガンドを有効成分として含有する薬学的組成物。

【請求項14】 請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、あるいは請求項2記載のペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該受容体タンパク質に対するリガンドの決定方法。

【請求項15】 請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、あるいは請求項2記載のペプチド又はその塩を使用することを特徴とする、リガンドと請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩との結合性を变化させる物質のスクリーニング方法。

【請求項16】 請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、及び／あるいは請求項2記載のペプチド又はその塩を構成要素として含むことを特

徴とする、請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質と該受容体タンパク質のリガンドとの間の結合性を变化させる物質のスクリーニング用キット。

【請求項17】 請求項15記載のスクリーニング方法又は請求項16記載のスクリーニング用キットを使用して得られる、請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質と該受容体タンパク質のリガンドとの間の結合性を变化させる物質。

【請求項18】 請求項17記載の物質を含有する薬学的組成物。

【請求項19】 請求項3記載のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

【請求項20】 請求項3記載のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列又は該塩基配列の一部を含むポリヌクレオチド。

【請求項21】 被検体中のmRNAと請求項20記載のポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションの強度を測定する工程を包含することを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質のmRNAの定量方法。

【請求項22】 被検体中のタンパク質と請求項9記載の抗体との間の結合の強度を測定する工程を包含することを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質の定量方法。

【請求項23】 請求項21記載の受容体タンパク質mRNAの定量方法又は請求項22記載の受容体タンパク質の定量方法を用いることを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型受容体の機能が関連する疾患の検査方法。

【請求項24】 候補物質を投与又は暴露した被検細胞又は被検動物における、請求項1記載のGタンパク質共役型受容体タンパク質の発現レベルを、請求項21記載の定量方法を用いてmRNAレベルで、あるいは請求項22記載の定量方法を用いてタンパク質レベルで測定する工程を包含することを特徴とする請求項1記載のGタンパク質共役型受容体の発現を变化させる物質のスクリーニング方法。

【請求項25】 請求項24記載のスクリーニング方法を用いて得られる請求項1記載のGタンパク質共役型受容体の発現を变化させる物質。

【請求項26】 請求項25記載の物質を有効成分として含む薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規なGタンパク質受容体タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、及び該タンパク質の製造方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】多くのホルモン、神経伝達物質等の生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的な受容体タンパク質を通じて生体中の機能を発揮している。これらの受容体タンパク質中の多くは、7個の膜貫通領域を有する共通した構造を有しており、GTP結合タンパク質（Gタンパク質ともいう）の活性化を通じて、細胞内シグナル伝達を行なうことからGタンパク質共役型受容体（GPCR：G protein coupled receptor）タンパク質といわれる。Gタンパク質共役型受容体タンパク質は、生体中に天然に存在するリガンド（例えば、前記生理活性物質）との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞増殖の活性化や抑制等の様々な生体内反応が惹起される。従って、生体内の各種細胞や臓器における複雑な機能を調節する物質と、その特異的な受容体タンパク質（特にGタンパク質共役型受容体タンパク質）との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の生理調節機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

【0003】ところで、ヒトゲノムの97%に及ぶドラフト配列が報告された現在もなお、全遺伝子数の予測数が議論となることで判るように、ゲノム塩基配列決定と遺伝子同定とは同義ではなく、異なる作業フェイズである。本発明者らは、数年前から未解析のゲノム塩基配列からの体系的遺伝子予測と転写・スプライシングレベルでの検証作業を進めてきた。その結果、現在の公共ESTデータベースにカタログ化された転写産物は、全転写産物の3.6～6.7割程度と見積もられた。すなわち、ESTアプローチによる遺伝子カタログ化作業の検出限界は、予想外に高く、転写量の低い遺伝子群の相当数が現時点で存在すら認識されていないと考えられる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】Gタンパク質共役型受容体タンパク質と生体内リガンドとの結合を阻害する物質（アンタゴニスト）、前記受容体に結合して生体内リガンドと同様なシグナル伝達を引き起こす物質（アゴニスト）は、前記受容体に関連する生体機能を調節する医薬品として利用されてきた。よって、Gタンパク質共役型受容体タンパク質を新たに見出し、該タンパク質の遺伝子をクローニングすることは、生体機能を科学的に理解する上において重要であるばかりでなく、新規の作用機作を有する効果的な医薬品の開発上、極めて重要である。ところが、生体中に存在する全てのGタンパク質共役型受容体が同定されているわけではなく、現在もなお未知のGタンパク質共役型受容体、及び対応するリガンドが未同定のいわゆるオーファン受容体が多数存在しており、新たなGタンパク質共役型受容体の探索および機能解明が切望されている。

【0005】Gタンパク質共役型受容体は、そのシグナル伝達作用を指標とする、新規生体内リガンドの探索、

該受容体に対するアゴニスト（刺激薬）またはアンタゴニスト（拮抗薬）の探索に有用である。一方、生理的なリガンドが同定されておらずとも、該受容体遺伝子の破壊実験（ノックアウト動物）の解析から、前記受容体の生理作用を解析することによって、該受容体に対するアゴニスト又はアンタゴニストを作製することも可能である。そのようにして作製されたアゴニスト又はアンタゴニストは、前記Gタンパク質共役型受容体の機能不全に起因する疾患の予防、診断又は治療薬として活用することが期待できる。さらに、Gタンパク質共役型受容体の遺伝子変異に起因する、生体内での該受容体の機能の昂進又は低下が、何らかの疾患の原因となっている場合もある。この場合には、前記受容体遺伝子の生体内（又は特定臓器）への導入や、前記受容体遺伝子に対するアンチセンス核酸の導入による、遺伝子治療に応用することもできる。その場合には、前記受容体遺伝子の塩基配列は、遺伝子上の欠失や変異の有無を調べるために不可欠な情報であり、該受容体遺伝子は、該受容体の機能不全に関連する疾患の予防、診断又は治療薬に応用することもできる。

【0006】本発明は、上記ように有用な新規なGタンパク質共役型受容体タンパク質を提供するものである。すなわち、新規なGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、該タンパク質の部分ペプチド又はその塩、該Gタンパク質共役型受容体タンパク質又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド（DNA、RNA又はそれらの誘導体）を含有するポリヌクレオチド（DNA、RNAおよびそれらの誘導体）、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを保持する形質転換体、該Gタンパク質共役型受容体タンパク質またはその塩の製造法、該Gタンパク質共役型受容体タンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する抗体、該Gタンパク質共役型受容体タンパク質の発現量を変化させる化合物、該Gタンパク質共役型受容体に対するリガンドの決定方法、リガンドと該Gタンパク質共役型受容体タンパク質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩のスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニング方法もしくはスクリーニングキットを用いて得られるリガンドと該Gタンパク質共役型受容体タンパク質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）またはその塩、およびリガンドと該Gタンパク質共役型受容体タンパク質との結合性を変化させる化合物（アンタゴニスト、アゴニスト）もしくは該Gタンパク質共役型受容体タンパク質の発現量を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬品などを提供する。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、VTS（virtual transcribed sequence）アプローチによって、ヒト由来の

新規なGタンパク質共役型受容体タンパク質をコードする遺伝子cDNAを取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】すなわち、本発明は、以下の(1)～(26)である。

(1) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むことを特徴とするGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩。

(2) 上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質の部分アミノ酸配列を含むことを特徴とするペプチドまたはその塩。

(3) 上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質又は上記(2)のペプチドをコードする塩基配列を含むことを特徴とするポリヌクレオチド。

【0009】(4) ポリヌクレオチドがDNAであることを特徴とする上記(3)のポリヌクレオチド。

(5) 配列番号1で表される塩基配列又は該塩基配列の一部を含む上記(3)のポリヌクレオチド。

(6) 上記(3)のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。

【0010】(7) 上記(6)の組換えベクターで形質転換させた形質転換体。

(8) 上記(7)の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質を採取することを特徴とする上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質またはその塩の製造方法。

(9) 上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、あるいは上記(2)のペプチドまたはその塩に対する抗体。

【0011】(10) 抗体が上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質のシグナル伝達を阻害する活性を有するものである上記(9)の抗体。

(11) 上記(9)の抗体を有効成分として含有する薬学的組成物。

(12) 上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質に対するリガンド。

【0012】(13) 上記(12)のリガンドを有効成分として含有する薬学的組成物。

(14) 上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、あるいは上記(2)のペプチドまたはその塩に対するリガンド候補物質の特異的結合能を調べる工程を含むことを特徴とする該受容体タンパク質に対するリガンドの決定方法。

(15) 上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、あるいは上記(2)のペプチド又はその塩を使用することを特徴とする、リガンドと上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩との結合性を变化させる物質のスクリーニング方法。

【0013】(16) 上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、及び/あるいは上記(2)のペ

プチド又はその塩を構成要素として含むことを特徴とする、上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質と該受容体タンパク質のリガンドとの間の結合性を变化させる物質のスクリーニング用キット。

(17) 上記(15)のスクリーニング方法又は上記(16)のスクリーニング用キットを使用して得られる、上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質と該受容体タンパク質のリガンドとの間の結合性を变化させる物質。

(18) 上記(17)の物質を含有する薬学的組成物。

【0014】(19) 上記(3)のポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド。

(20) 上記(3)のポリヌクレオチドと相補的な塩基配列又は該塩基配列の一部を含むポリヌクレオチド。

(21) 被検体中のmRNAと上記(20)のポリヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションの強度を測定する工程を包含することを特徴とする上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質のmRNAの定量方法。

【0015】(22) 被検体中のタンパク質と上記(9)の抗体との間の結合の強度を測定する工程を包含することを特徴とする上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質の定量方法。

(23) 上記(21)の受容体タンパク質mRNAの定量方法又は上記(22)の受容体タンパク質の定量方法を用いることを特徴とする上記(1)のGタンパク質共役型受容体の機能が関連する疾患の検査方法。

(24) 候補物質を投与又は暴露した被検細胞又は被検動物における、上記(1)のGタンパク質共役型受容体タンパク質の発現レベルを、上記(21)の定量方法を用いてmRNAレベルで、あるいは上記(22)の定量方法を用いてタンパク質レベルで測定する工程を包含することを特徴とする上記(1)のGタンパク質共役型受容体の発現を变化させる物質のスクリーニング方法。

【0016】(25) 上記(24)のスクリーニング方法を用いて得られる上記(1)のGタンパク質共役型受容体の発現を变化させる物質。

(26) 上記(25)の物質を有効成分として含む薬学的組成物。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0017】

【発明の実施の形態】本発明のGタンパク質共役型受容体タンパク質（受容体タンパク質ともいう）は、配列番号2で表わされるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体タンパク質である。本受容体タンパク質は、以下のようにして得ることができる。

【0018】1. 本発明の受容体タンパク質をコードする遺伝子のクローニング

本発明の受容体タンパク質をコードする遺伝子は、VTS（virtual transcribed sequence：仮想転写配列）アプ

ローチによってクローニングすることができる。ここで「VTSアプローチ」とは、①ヒトゲノム配列データから、遺伝子予測プログラムによって遺伝子コード領域を予測及びリスト化し、②ESTとして確認されていないVTSを、多様なRNA源からRT-PCRによって検出し、③検出された断片の塩基配列を決定することによってスプライシングの有無を確認し、④実在遺伝子としての評価を与えることによって、実際に発現されている新規遺伝子を同定する手法をいう。以下、本発明の受容体タンパク質をコードする遺伝子のクローニング方法を、図1を用いて具体的に説明する。

【0019】まず、GENSCAN等の遺伝子予測プログラムによってヒトゲノム配列上に遺伝子コード領域を予測し、それらをリスト化してVTSデータベースを構築する。次いで、仮想転写配列（VTS）群に対して、データベース中から未だESTとして発現が確認されておらず、Gタンパク質共役型受容体タンパク質をコードすると考えられるVTSを検索する。ここで、検索には複数のGタンパク質共役型受容体タンパク質中に存在するアミノ酸配列を、query配列（問合わせ配列）として使用することが

【0020】得られたVTSの、ゲノム配列上に予測されるエクソン及びイントロンに基づいて、図1(a)のように1個以上のイントロンを挟むようエクソン上にプライマー配列を設計・合成する。ここで、プライマーの設計は、OLIGO（National Biosciences社）等の市販のプライマー設計ソフトを用いて行うことができる。設定したプライマーを用い、多様なRNA源を用いてRT-PCRを行う。ここで、RNAの供給源としては、ヒト由来のあらゆる細胞（例えば、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、骨髄細胞、ランゲルハンス細胞、上皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞等）、又はそれらの細胞が存在するあらゆる組織（例えば、脳、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋等）が挙げられる。前記細胞及び組織は、人工中絶又は自然流産したヒトから調製することもできる。RNAの調製は、当該技術分野において通常用いられる手法により行うことができる。

【0021】RT-PCRによって得られるDNA断片〔図1の(c)：実証エクソン配列〕の塩基配列を決定する。これにより当該DNA断片が、ゲノム配列から予測されるスプライシング物〔図1の(b)：予測エクソン配列〕と同一であることを確認する。次いで、確認された配列に基づいて設計したプライマーを用いて5'-RACE及び3'-RACEを実行する〔図1の(d)〕する。これにより本発明のGタンパク質共役型受容体タンパク質の全長アミノ酸配列をコードするcDNAの塩基配列を明らかにすることができる〔図1の(e)〕。

【0022】本発明において、ヒトからクローニングさ

れた新規なGタンパク質受容体タンパク質及び該タンパク質をコードする遺伝子cDNAを例示すると以下のようになる。すなわち、配列番号2は、ヒト由来のGタンパク質受容体タンパク質GPR97のアミノ酸配列であり、配列番号1は、当該タンパク質をコードする遺伝子cDNAの塩基配列である。一旦、本発明の遺伝子cDNAの塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、あるいはPCRによって本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。例えば、本発明のGPR97タンパク質の全長アミノ酸配列（配列番号2）をコードするDNA（配列番号1）は、ヒト骨髄由来cDNAを鋳型として、5'-atggcgacgccaggggcct-3'（配列番号4）及び5'-ttcttgagatggagtgagg-3'（配列番号5）の塩基配列を有するプライマーを用いることにより、PCRによって容易に調製することができる。但し、本発明においては、プライマーはこれらに限定されるものではない。

【0023】2. 本発明の受容体タンパク質及びその部分ペプチド

本発明の受容体タンパク質は、配列番号2で表わされるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。ここで、「実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質」とは、配列番号2で表わされるアミノ酸配列と約50%以上、好ましくは約70%以上、より好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を含み、且つ配列番号2で表わされるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をいう。「実質的に同質の活性」とは、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用等の受容体タンパク質が元来有する生物活性が性質的に同質であることをいう。より詳細には、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用等の生物活性が同等（例えば、約0.01～100倍、好ましくは約0.5～20倍、より好ましくは約0.5～2倍）である限り、分子量等の量的要素は元のタンパク質と異なってもよい。なお、リガンド結合活性やシグナル情報伝達作用などの活性の測定は、公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、後述するリガンドの決定方法等に従って測定することができる。

【0024】配列番号2で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質としては、配列番号2で表わされるアミノ酸配列中の1又は2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号2で表わされるアミノ酸配列に1又は2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、並びに配列番号2で表わされるアミノ酸配列中の1又は2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは1～5個）のアミノ酸が他のアミノ酸で

置換されたアミノ酸配列を含むタンパク質が挙げられる。上記アミノ酸の欠失、付加及び置換は、受容体タンパク質をコードする遺伝子を、当該技術分野で公知の方法によって、改変することによって行うことができる。例えば、特定のアミノ酸残基の置換は、市販のキット（例えば、Mutan™-G（TAKARA社）、Mutan™-K（TAKARA社））等を使用し、Gappedduplex法やKunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法によって、塩基の置換を行なうことによって達成することができる。

【0025】また、本発明の受容体タンパク質のC末端は、通常カルボキシル基（-COOH）であるが、当該カルボキシル基は、アミド（-CONH₂）やエステル（-COOR）等に化学修飾されていてもよい。ここで、エステル中のRとしては、C₁₋₆ アルキル基（例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル）、C₃₋₈シクロアルキル基（例えば、シクロペンチル、シクロヘキシル）、C₆₋₁₂ アリール基（例えば、フェニル、 α -ナフチル）、フェニル-C₁₋₂ アルキル基（例えば、ベンジル、フェネチル）、 α -ナフチル-C₁₋₂ アルキル基（例えば、 α -ナフチルメチル）等が挙げられる。その他、経口用エステルとして汎用されているピバロイルオキシメチルエステルとすることも可能である。本発明の受容体タンパク質がC末端以外にもそのポリペプチド鎖中にカルボキシル基を有する場合には、当該カルボキシル基がアミド化又はエステル化されているものも、本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては上記の各エステルが挙げられる。同様に、本発明の受容体タンパク質のN末端は、通常アミノ基（-NH₂）であるが、当該アミノ基は、ホルミル基、アセチル基等のC₁₋₆ アシル基等で化学修飾されていてもよい。その他、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したものや、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば、-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な官能基（例えば、ホルミル基、アセチル等）で化学修飾されているものや糖鎖の結合しているものも本発明のタンパク質に含まれる。

【0026】上記いずれかの受容体タンパク質中の部分アミノ酸配列を含むペプチド（部分ペプチドともいう）も本発明の範囲に含まれる。すなわち、本発明の部分ペプチドは、配列番号2で表されるアミノ酸配列と同一又は実質的に同一のアミノ酸配列の一部のアミノ酸配列を含むものである限り、いずれのものであってもよい。特に、本発明の部分ペプチドの中でも、受容体タンパク質が天然に存在する場合に細胞膜の外に露出し、且つリガンド結合活性を保有する部分は、受容体タンパク質のリガンドを決定において特に有用である。そのような部分ペプチドとしては、配列番号2で表わされるアミノ酸配列の疎水性プロット解析において、細胞外領域（親水性部位）と分析される部分が挙げられる。本発明の部分ペ

プチドを構成するアミノ酸数は、少なくとも10個以上、好ましくは30個以上、より好ましくは80個以上である。通常、本発明の部分ペプチドのC末端はカルボキシル基（-COOH）、N末端はアミノ基（-NH₂）であるが、これらは前記受容体タンパク質の場合のように、化学修飾されていてもよい。

【0027】本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチドは、必要に応じて塩の形態、好ましくは生理学的に許容される酸付加塩の形態で提供され得る。そのような塩としては、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）の塩、有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）の塩等が挙げられる。本発明の受容体タンパク質又はその塩は、本発明の受容体タンパク質を発現しているヒトや哺乳動物の培養細胞又は組織からの抽出・分離によって、あるいは後述のように本発明の受容体タンパク質をコードするDNAを含む形質転換体を培養することによっても製造することができる。ヒトや哺乳動物の組織又は細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズ後、酸等で抽出を行ない、得られた抽出液を疎水クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィーを組み合わせることにより単離精製することができる。

【0028】また、本発明の部分ペプチドまたはその塩は、公知のペプチド合成法又は前記受容体タンパク質を適当なペプチダーゼ（例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ）で切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。すなわち、本発明の受容体タンパク質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。合成反応後は通常精製法、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを単離精製することができる。上記の方法で得られる受容体タンパク質又はその部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、反対に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0029】3. 本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド

本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドは、上記2の受容体タンパク質又はその部分ペプチドをコードする塩基配列（DNA又はRNA）を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明の受容体タン

パク質をコードするDNA、mRNA等のRNAが挙げられ、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNA又はDNAとRNAとのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖（すなわち、コード鎖）であっても、アンチセンス鎖（すなわち、非コード鎖）であってもよい。本発明の受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明の受容体タンパク質のmRNAを定量することができる。本発明の受容体タンパク質をコードするDNAは、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、上記1の細胞若しくは組織由来のcDNA、又は上記1の細胞若しくは組織由来のcDNAライブラリーから調製したもの、あるいは合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記1の細胞又は組織から調製した全RNA又はmRNA画分を用いて直接、RT-PCR法（Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction）によって増幅することもできる。具体的には、本発明の受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとしては、上記1のように配列番号1で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドが挙げられるが、これらのいずれかのポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、且つ本発明の受容体タンパク質と実質的に同質の活性（例えば、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用）を有する受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドであればいずれのものであってもよい。

【0030】配列番号1で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、配列番号1で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNA等が挙げられる。ここで、「ストリンジントな条件」とはとは、ナトリウム濃度が約20～40mM、好ましくは約20～25mM、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件をいう。

【0031】4. 組換えベクター及び形質転換体の作製
(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明の受容体タンパク質をコードするDNAを連結することにより得ることができる。本発明の遺伝子を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAとしては、大腸菌由来のプラスミド（例えばpBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pCBD-C等）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110、pTP5、pC194等）、酵母由来のプラスミド（例えばYEpl3、YEpl4、YCp50、YIp30等）などが挙げられ、ファ

ージDNAとしてはλファージ等が挙げられる。さらに、レトロウイルス、ワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルス、トガウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

【0032】ベクターへの本発明の受容体遺伝子の連結は、上記1においてクローニングされた受容体タンパク質をコードするDNAをそのまま、又は所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加し、ベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入することにより行うことができる。連結するDNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGA又はTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。連結するDNAは、当該DNA中にコードされている本発明の受容体タンパク質が宿主細胞中で発現されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明の組換えベクターには、受容体タンパク質コード配列の以外にも、プロモーター、選択マーカー、ターミネーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、リボソーム結合配列（SD配列）などを連結することができる。

【0033】ここで、本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであれば特に限定されない。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SRαプロモーター、CMVプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、HSV-TKプロモーター等が挙げられる。宿主が大腸菌である場合には、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λ P_Lプロモーター、lppプロモーター等が、宿主が枯草菌である場合には、SP01プロモーター、SP02プロモーター、penPプロモーター等が、宿主が酵母である場合には、PH05プロモーター、PCKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーター等が挙げられる。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。なお、選択マーカーとしては、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等が挙げられる。

【0034】(2) 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌（*Escherichia coli*）等のエシェリヒア属、バチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）等のバチルス属、シュードモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*）等のシュードモナス属、リゾビウム・メリロティ（*Rhizobium meliloti*）等のリゾビウム属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyce*

s. cerevisiae)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等の酵母、サル細胞COS-7、Ver o、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞)、マウスL細胞、ヒトGH3、ヒトFL細胞等の動物細胞、あるいは Sf9、Sf21等の昆虫細胞が挙げられる。

【0035】大腸菌への組換えベクターの導入方法としては、カルシウムイオンを用いる方法[Cohen, S.N. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69: 2110(1972)]、エレクトロポレーション法等が挙げられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、エレクトロポレーション法[Becker, D.M. et al.: Methods. Enzymol., 194: 182(1990)]、スフェロプラスト法[Hinnen, A. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75: 1929(1978)]、酢酸リチウム法[Itoh, H.: J. Bacteriol., 153: 163(1983)]等が挙げられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0036】5. 本発明の受容体タンパク質の製造
本発明の受容体タンパク質は、上記4において得られる形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより製造することができる。「培養物」とは、培養上清、あるいは培養細胞若しくは培養菌体又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。無機塩類としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガ、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0037】培養は、宿主細胞に適した条件下で行う。例えば、大腸菌を培養する際の培地としては、LB培地、M9培地等が好ましい。所望によりプロモーターを効率よく働かせるために、イソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトシド、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。大腸菌の場合、培養は通常約15

～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主が枯草菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。酵母培養するための培地としては、SD培地、YPD培地があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、ウシ血清を含むグレース昆虫培地等が挙げられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地、DMEM培地、RPMI 1640培地等が用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。以上のようにして、形質転換体の細胞膜等に本発明の受容体タンパク質を生成させることができる。上記培養物から本発明の受容体タンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

【0038】本発明の受容体タンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチーム及び／又は凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離や濾過により受容体タンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤や、トリトンX-100などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に受容体タンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。このようにして得られた培養上清又は抽出液に含まれる受容体タンパク質の精製は、公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離・精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、及びSDS-PAGE等の主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

【0039】6. 本発明のアンチセンスポリヌクレオチド

本発明の受容体タンパク質をコードする遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンスポリヌクレオチドを、上記1においてクローニングした受容体タンパク質をコードするDNAの塩基配列情報に基づいて、設計・合成することができる。具体的には、本発明のアン

チセンスポリヌクレオチドとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むGタンパク質受容体タンパク質又は該タンパク質の部分ペプチドをコードする塩基配列と相補的であるか、あるいはストリンジェントな条件下でハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドが挙げられる。そのようなアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明の受容体タンパク質遺伝子のmRNAの少なくとも一部に相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドであり、当該mRNAにハイブリダイズすることによって、当該受容体タンパク質遺伝子の発現を調節又は制御することができる。前記アンチセンスポリヌクレオチドは、本発明の受容体タンパク質の発現の調節又は制御以外にも、本発明の受容体遺伝子が関連する疾患の治療又は診断に有用である。

【0040】前記アンチセンスポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシリボヌクレオチド、D-リボースを含有しているポリリボヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販のペプチド核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（ただし、該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）等が挙げられる。それらは、二本鎖DNA、一本鎖DNA、二本鎖RNA、一本鎖RNA、さらにDNAとRNAとのハイブリッドであり得、さらに非修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、例えばタンパク質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であり得る。

【0041】本発明のアンチセンスポリヌクレオチドは、リポソーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、特定の化合物や修飾基を結合させた形態で与

えられることができる。具体的には、アンチセンスポリヌクレオチドに結合させる物質としては、アンチセンスポリヌクレオチドがDNAである場合、のリン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジン等のポリカチオン体、アンチセンスポリヌクレオチドと細胞膜との相互作用を高め、細胞内へのアンチセンスポリヌクレオチドの取込みを増大させるホスホリッピドやコレステロール等の粗水性物質、ヌクレアーゼによるアンチセンスポリヌクレオチドの分解を阻止するポリエチレングリコール、テトラエチレングリコール等のグリコール化合物が挙げられるが、それに限定されるものではない。

【0042】なお、本発明のアンチセンスポリヌクレオチドの、受容体タンパク質遺伝子の発現阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいは本発明の受容体タンパク質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。

【0043】7. 本発明の受容体タンパク質に対するリガンドの決定方法

本発明のリガンド決定方法においては、本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチドと候補物質（試験物質）とを接触させた場合の、該受容体タンパク質又は該部分ペプチドに対する候補物質の結合量や、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。より具体的には、本発明は、①標識した試験化合物を、本発明の受容体タンパク質若しくはその塩、又は本発明の部分ペプチド若しくはその塩に接触させた場合における、標識した候補物質の前記受容体タンパク質若しくはその塩、又は該部分ペプチド若しくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の受容体タンパク質またはその塩に対するリガンドの決定方法、②標識した候補物質を、本発明の受容体タンパク質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した候補物質の該細胞又は該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とする本発明の受容体タンパク質又はその塩に対するリガンドの決定方法、③標識した候補物質を、本発明の受容体タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した受容体タンパク質に接触させた場合における、標識した候補物質の該受容体タンパク質又はその塩に対する結合量を測定しすることを特徴とする本発明の受容体タンパク質に対するリガンドの決定方法、④候補物質を、本発明の受容体タンパク質を含有する細胞に接触させた場合における、受容体タンパク質を介した細胞刺激活性（例えば、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性等）を測定することを特徴とする本発明の受容体タンパク質又はその塩に対するリガンドの決定方法、並びに⑤候補物質を、本発明の受容体タンパク質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することに

よってその細胞膜上に発現した受容体タンパク質に接触させた場合における、受容体タンパク質を介する細胞刺激活性（例えば、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内タンパク質のリン酸化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することの特徴とする本発明の受容体タンパク質又はその塩に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0044】本発明のリガンド決定方法に用いる受容体タンパク質としては、前記の本発明の受容体タンパク質又は本発明の部分ペプチドを含有するものであればいずれであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させた受容体タンパク質が特に好ましい。

【0045】8. 本発明の受容体タンパク質に対する抗体

本発明の抗体は、配列番号2で表されるアミノ酸配列と同一若しくは実質的に同一のアミノ酸配列を含むGタンパク質共役型受容体タンパク質又はその塩、あるいは該受容体タンパク質の部分アミノ酸配列を含むペプチド又はその塩に対する抗体である。本発明の抗体は、本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチドを認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。本発明の抗体は、本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチド等を抗原として用い、当該技術分野で公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

【0046】(1) モノクローナル抗体の作製

(i) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明の受容体タンパク質等は、哺乳動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。

【0047】抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化受容体タンパク質等と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法[Nature, 256, 495(1975)]に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)やセンダ

イウイルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30℃～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、受容体タンパク質等抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した受容体タンパク質等を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20℃～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

【0048】(ii) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法（例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法）に従って行なうことができる。

【0049】(2) ポリクローナル抗体の作製

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（例えば、受容体タンパク質）とキャリア

ータンパク質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明の受容体タンパク質等に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアータンパク質との複合体に関し、キャリアータンパク質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンベット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1〜20、好ましくは約1〜5の割合でカップルさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。縮合生成物は、哺乳動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2〜6週毎に1回ずつ、計約3〜10回程度行なうことができる。ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様に測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

【0050】9. 本発明の受容体タンパク質及びその部分ペプチドのその他の医学薬学的応用

本発明の受容体タンパク質及びその部分ペプチド又はこれらの塩、並びにそれらをコードするポリヌクレオチドは、①本発明の受容体タンパク質に対するリガンド（アゴニスト）の決定、②本発明の受容体タンパク質の機能不全に関連する疾患の予防及び／又は治療剤、③遺伝子診断剤、④本発明の受容体タンパク質に対するリガンドの定量、⑤本発明の受容体タンパク質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニストなど）のスクリーニング、⑥本発明の受容体タンパク質とリガンドとの結合性を变化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防及び／又は治療剤、⑦本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチドの定量、⑧本発明の受容体タンパク質又はその部分ペプチドに対する抗体による中和、⑨本発明の受容体タンパク質をコードする遺伝子を有する非ヒト動物の作製などに用いることができる。特に、本発明の組換え型受容体タンパク質の発現系を用いた受容体結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な

受容体タンパク質に対するリガンドの結合性を变化させる物質（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

【0051】具体的には、本発明の受容体タンパク質若しくはその部分ペプチド、又はそれら塩は、本発明の受容体タンパク質に対するリガンド（アゴニスト）又はアンタゴニストを探索（スクリーニング）し、または決定するための試薬として有用である。これらの試薬は、本発明の受容体タンパク質に対するリガンドの結合性を变化させる物質のスクリーニング用キットの構成要素とすることが可能である。以上より、本発明は、本発明の受容体タンパク質若しくはその部分ペプチド、又はそれらの塩と、試験物質とを接触させることを特徴とする本発明の受容体タンパク質に対するリガンド（アゴニスト）又はアンタゴニストの決定方法を提供する。試験物質としては、ヒトまたは哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サルなど）の組織抽出物、細胞培養上清、人工的に合成した化合物等が挙げられる。

【0052】本発明の受容体タンパク質またはその塩に対するリガンドを決定する方法を実施するためには、適当な受容体タンパク質画分と、標識した試験物質が用いられる。受容体タンパク質画分としては、天然の受容体タンパク質画分、またはそれと同等の活性を有する組換え型受容体タンパク質画分等が好ましい。例えば、本発明の受容体タンパク質又はその塩に対するリガンドの決定を行なうには、まず本発明の受容体タンパク質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することにより受容体標品を調製する。バッファーとしては、リン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドと受容体タンパク質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80、デオキシコレートなどの界面活性剤や、ウシ血清アルブミンやゼラチン等のタンパク質をバッファーに加えることもできる。受容体タンパク質を含む溶液に、一定量の放射性標識した試験物質を共存させる。非特異的結合量を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は約4〜50℃、好ましくは約4℃〜37℃で、約10分〜24時間、望ましくは約30分〜3時間行なう。反応後、濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンター等で計測する。全結合量から非特異的結合量を引いたカウントが0 cpmを越える試験物質を本発明の受容体タンパク質又はその塩に対するリガンド（アゴニスト）として選択することができる。

【0053】本発明の受容体タンパク質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じ、本発明の受容体タンパク質又は当該受容体タンパク

質をコードするポリヌクレオチドを、本発明の受容体タンパク質の機能不全に関連する疾患の予防及び／又は治療剤などの医薬として使用することができる。

【0054】

【実施例】以下に、本発明の実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】 本発明のGタンパク質共役型受容体タンパク質をコードする遺伝子cDNAのクローニング

以下のようにして、本発明のGタンパク質共役型受容体タンパク質をコードする遺伝子cDNAをクローニングした。すなわち、まず、遺伝子予測プログラムGENSCANを用いて、公知のヒトゲノム配列から広範囲に遺伝子候補、すなわち仮想転写配列（VTS）をリスト化した。次いで、リスト化した配列と公知の遺伝子配列とのホモロジー比較を行った。得られたホモロジーレポートのトップヒットのコメントをキーワード対象としてVTS群をデータベース化し、当該データベース中にキーワード「Gタンパク質共役型受容体」を検索した。その結果、公知のGタンパク質共役型受容体タンパク質のアミノ酸配列と有意な類似を示す1つのVTSが得られた。

【0055】得られたVTSの、ゲノム配列上に予測されるエクソン及びイントロンに基づいて、推定イントロンを挟むよう推定エクソン上に、上流側プライマー5'-acttcctgctctgtgccttca-3'（配列番号6）及び下流側プライマー5'-gcaaagatgtagacggtggag-3'（配列番号7）配列を設計・合成した。これらのプライマーを用い、ヒトの種々の臓器（脳、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、結腸、肺、小腸、筋、胃、精巣、胎盤、唾液腺、甲状腺、膵

臓、副腎腺、卵巣、子宮、前立腺、皮膚、末梢血リンパ球、骨髓、胎児脳、胎児肝）由来のRNAを用いて、最初95℃で1分間処理後、95℃20秒間及び66℃1分間を1サイクルとして、RT-PCRを合計30サイクル行った。その結果、図2に示したように、骨髓由来のRNAを用いた場合に発現が観察された。得られたPCR断片の塩基配列を決定したところ、想定されるスプライシング後の想定されるmRNAの配列と一致することが判明し、生体内で、上記VTSが、実際に発現していることが判った。

【0056】次いで、確認された配列をに基づいて、5'-RACE及び3'-RACE用の特異的オリゴヌクレオチドプライマーを設計・合成し、これらを用いて常法に従い5'-RACE及び3'-RACEを行った。先に得られたDNA断片の上流側及び下流側の塩基配列を決定した。上記一連の操作により決定した塩基配列を配列番号3に示した。当該塩基配列中には、新規のGタンパク質共役型受容体タンパク質GPR97（配列番号2）をコードする領域が見出された。前記のように、当該遺伝子は、骨髓中で特異的に発現することより、幼若血液系細胞特異的機能又は造血系組織特異的機能に関与するものと考えられる。

【0057】

【発明の効果】本発明によって、新規なGタンパク質受容体タンパク質、該タンパク質をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、該組換えベクターを含む形質転換体、及び該タンパク質の製造方法等が提供される。上記タンパク質等は、新規な医薬品等の開発に有用である。

【0058】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<110> PharmaDesign, Inc.
<120> A gene coding for nobel G protein coupled receptor GPR97
<130> PDP-0004
<160> 7

<210> 1
<211> 1647
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1647)
<400> 1
atg gcg acg ccc agg ggc ctg ggg gcc ctg ctc ctg ctc ctc ctg ctc 48
Met Ala Thr Pro Arg Gly Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu
      1           5           10           15
ccg acc tca ggt cag gaa aag ccc acc gaa ggg cca aga aac acc tgc 96
Pro Thr Ser Gly Gln Glu Lys Pro Thr Glu Gly Pro Arg Asn Thr Cys
                20           25           30

```

23	24
ctg ggg agc aac aac atg tac gac atc ttc aac ttg aat gac aag gct Leu Gly Ser Asn Asn Met Tyr Asp Ile Phe Asn Leu Asn Asp Lys Ala 35 40 45	144
ttg tgc ttc acc aag tgc agg cag tgc ggc agc gac tcc tgc aat gtg Leu Cys Phe Thr Lys Cys Arg Gln Ser Gly Ser Asp Ser Cys Asn Val 50 55 60	192
gaa aac ttg cag aga tac tgg cta aac tac gag gcc cat ctg atg aag Glu Asn Leu Gln Arg Tyr Trp Leu Asn Tyr Glu Ala His Leu Met Lys 65 70 75 80	240
gaa ggt ttg acg cag aag gtg aac acg cct ttc ctg aag gct ttg gtc Glu Gly Leu Thr Gln Lys Val Asn Thr Pro Phe Leu Lys Ala Leu Val 85 90 95	288
cag aac ctc agc acc aac act gca gaa gac ttc tat ttc tct ctg gag Gln Asn Leu Ser Thr Asn Thr Ala Glu Asp Phe Tyr Phe Ser Leu Glu 100 105 110	336
ccc tct cag gtt ccg agg cag gtg atg aag gac gag gac aag ccc cct Pro Ser Gln Val Pro Arg Gln Val Met Lys Asp Glu Asp Lys Pro Pro 115 120 125	384
gac aga gtg cga ctt ccc aag agc ctt ttt cga tcc ctg cca ggc aac Asp Arg Val Arg Leu Pro Lys Ser Leu Phe Arg Ser Leu Pro Gly Asn 130 135 140	432
agg tct gtg gtc cgc ttg gcc gtc acc att ctg gac att ggt cca ggg Arg Ser Val Val Arg Leu Ala Val Thr Ile Leu Asp Ile Gly Pro Gly 145 150 155 160	480
act ctc ttc aag ggc ccc cgg ctc ggc ctg gga gat ggc agc ggc gtg Thr Leu Phe Lys Gly Pro Arg Leu Gly Leu Gly Asp Gly Ser Gly Val 165 170 175	528
ttg aac aat cgc ctg gtg ggt ttg agt gtg gga caa atg cat gtc acc Leu Asn Asn Arg Leu Val Gly Leu Ser Val Gly Gln Met His Val Thr 180 185 190	576
aag ctg gct gag cct ctg gag atc gtc ttc tct cac cag cga ccg ccc Lys Leu Ala Glu Pro Leu Glu Ile Val Phe Ser His Gln Arg Pro Pro 195 200 205	624
cct aac atg acc ctc acc tgt gta ttc tgg gat gtg act aaa ggg acc Pro Asn Met Thr Leu Thr Cys Val Phe Trp Asp Val Thr Lys Gly Thr 210 215 220	672
act gga gac tgg tct tct gag ggc tgc tcc acg gag gtc aga cct gag Thr Gly Asp Trp Ser Ser Glu Gly Cys Ser Thr Glu Val Arg Pro Glu 225 230 235 240	720
ggg acc gtg tgc tgc tgt gac cac ctg acc ttt ttc gcc ctg ctc ctg Gly Thr Val Cys Cys Cys Asp His Leu Thr Phe Phe Ala Leu Leu Leu 245 250 255	768
aga ccc acc ttg gac cag tcc acg gtg cat atc ctc aca cgc atc tcc Arg Pro Thr Leu Asp Gln Ser Thr Val His Ile Leu Thr Arg Ile Ser 260 265 270	816
cag gcg ggc tgt ggg gtc tcc atg atc ttc ctg gcc ttc acc att att Gln Ala Gly Cys Gly Val Ser Met Ile Phe Leu Ala Phe Thr Ile Ile 275 280 285	864
ctt tat gcc ttt ctg agg ctt tcc cgg gag agg ttc aag tca gaa gat Leu Tyr Ala Phe Leu Arg Leu Ser Arg Glu Arg Phe Lys Ser Glu Asp	912

25	26
290	295 300
gcc cca aag atc cac gtg gcc ctg ggt ggc agc ctg ttc ctc ctg aat	960
Ala Pro Lys Ile His Val Ala Leu Gly Gly Ser Leu Phe Leu Leu Asn	
305	310 315 320
ctg gcc ttc ttg gtc aat gtg ggg agt ggc tca aag ggg tct gat gct	1008
Leu Ala Phe Leu Val Asn Val Gly Ser Gly Ser Lys Gly Ser Asp Ala	
325	330 335
gcc tgc tgg gcc cgg ggg gct gtc ttc cac tac ttc ctg ctc tgt gcc	1056
Ala Cys Trp Ala Arg Gly Ala Val Phe His Tyr Phe Leu Leu Cys Ala	
340	345 350
ttc acc tgg atg ggc ctt gaa gcc ttc cac ctc tac ctg ctc gct gtc	1104
Phe Thr Trp Met Gly Leu Glu Ala Phe His Leu Tyr Leu Leu Ala Val	
355	360 365
agg gtc ttc aac acc tac ttc ggg cac tac ttc ctg aag ctg agc ctg	1152
Arg Val Phe Asn Thr Tyr Phe Gly His Tyr Phe Leu Lys Leu Ser Leu	
370	375 380
gtg ggc tgg ggc ctg ccc gcc ctg atg gtc atc ggc act ggg agt gcc	1200
Val Gly Trp Gly Leu Pro Ala Leu Met Val Ile Gly Thr Gly Ser Ala	
385	390 395 400
aac agc tac ggc ctc tac acc atc cgt gat agg gag aac cgc acc tct	1248
Asn Ser Tyr Gly Leu Tyr Thr Ile Arg Asp Arg Glu Asn Arg Thr Ser	
405	410 415
ctg gag cta tgc tgg ttc cgt gaa ggg aca acc atg tac gcc ctc tat	1296
Leu Glu Leu Cys Trp Phe Arg Glu Gly Thr Thr Met Tyr Ala Leu Tyr	
420	425 430
atc acc gtc cac ggc tac ttc ctc atc acc ttc ctc ttt ggc atg gtg	1344
Ile Thr Val His Gly Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Leu Phe Gly Met Val	
435	440 445
gtc ctg gcc ctg gtg gtc tgg aag atc ttc acc ctg tcc cgt gct aca	1392
Val Leu Ala Leu Val Val Trp Lys Ile Phe Thr Leu Ser Arg Ala Thr	
450	455 460
gcg gtc aag gag cgg ggg aag aac cgg aag aag gtg ctc acc ctg ctg	1440
Ala Val Lys Glu Arg Gly Lys Asn Arg Lys Lys Val Leu Thr Leu Leu	
465	470 475 480
ggc ctc tcg agc ctg gtg ggt gtg aca tgg ggg ttg gcc atc ttc acc	1488
Gly Leu Ser Ser Leu Val Gly Val Thr Trp Gly Leu Ala Ile Phe Thr	
485	490 495
ccg ttg ggc ctc tcc acc gtc tac atc ttt gca ctt ttc aac tcc ttg	1536
Pro Leu Gly Leu Ser Thr Val Tyr Ile Phe Ala Leu Phe Asn Ser Leu	
500	505 510
caa ggt gtc ttc atc tgc tgc tgg ttc acc atc ctt tac ctc cca agt	1584
Gln Gly Val Phe Ile Cys Cys Trp Phe Thr Ile Leu Tyr Leu Pro Ser	
515	520 525
cag agc acc aca gtc tcc tcc tct act gca aga ttg gac cag gcc cac	1632
Gln Ser Thr Thr Val Ser Ser Ser Thr Ala Arg Leu Asp Gln Ala His	
530	535 540
tcc gca tct caa gaa	1647
Ser Ala Ser Gln Glu	
545	

<210> 2

<211> 549

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Thr Pro Arg Gly Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu
  1             5             10             15
Pro Thr Ser Gly Gln Glu Lys Pro Thr Glu Gly Pro Arg Asn Thr Cys
          20             25             30
Leu Gly Ser Asn Asn Met Tyr Asp Ile Phe Asn Leu Asn Asp Lys Ala
          35             40             45
Leu Cys Phe Thr Lys Cys Arg Gln Ser Gly Ser Asp Ser Cys Asn Val
          50             55             60
Glu Asn Leu Gln Arg Tyr Trp Leu Asn Tyr Glu Ala His Leu Met Lys
          65             70             75             80
Glu Gly Leu Thr Gln Lys Val Asn Thr Pro Phe Leu Lys Ala Leu Val
          85             90             95
Gln Asn Leu Ser Thr Asn Thr Ala Glu Asp Phe Tyr Phe Ser Leu Glu
          100            105            110
Pro Ser Gln Val Pro Arg Gln Val Met Lys Asp Glu Asp Lys Pro Pro
          115            120            125
Asp Arg Val Arg Leu Pro Lys Ser Leu Phe Arg Ser Leu Pro Gly Asn
          130            135            140
Arg Ser Val Val Arg Leu Ala Val Thr Ile Leu Asp Ile Gly Pro Gly
          145            150            155            160
Thr Leu Phe Lys Gly Pro Arg Leu Gly Leu Gly Asp Gly Ser Gly Val
          165            170            175
Leu Asn Asn Arg Leu Val Gly Leu Ser Val Gly Gln Met His Val Thr
          180            185            190
Lys Leu Ala Glu Pro Leu Glu Ile Val Phe Ser His Gln Arg Pro Pro
          195            200            205
Pro Asn Met Thr Leu Thr Cys Val Phe Trp Asp Val Thr Lys Gly Thr
          210            215            220
Thr Gly Asp Trp Ser Ser Glu Gly Cys Ser Thr Glu Val Arg Pro Glu
          225            230            235            240
Gly Thr Val Cys Cys Cys Asp His Leu Thr Phe Phe Ala Leu Leu Leu
          245            250            255
Arg Pro Thr Leu Asp Gln Ser Thr Val His Ile Leu Thr Arg Ile Ser
          260            265            270
Gln Ala Gly Cys Gly Val Ser Met Ile Phe Leu Ala Phe Thr Ile Ile
          275            280            285
Leu Tyr Ala Phe Leu Arg Leu Ser Arg Glu Arg Phe Lys Ser Glu Asp
          290            295            300
Ala Pro Lys Ile His Val Ala Leu Gly Gly Ser Leu Phe Leu Leu Asn
          305            310            315            320
Leu Ala Phe Leu Val Asn Val Gly Ser Gly Ser Lys Gly Ser Asp Ala
          325            330            335
Ala Cys Trp Ala Arg Gly Ala Val Phe His Tyr Phe Leu Leu Cys Ala
          340            345            350
Phe Thr Trp Met Gly Leu Glu Ala Phe His Leu Tyr Leu Leu Ala Val

```

29

30

355 360 365
 Arg Val Phe Asn Thr Tyr Phe Gly His Tyr Phe Leu Lys Leu Ser Leu
 370 375 380
 Val Gly Trp Gly Leu Pro Ala Leu Met Val Ile Gly Thr Gly Ser Ala
 385 390 395 400
 Asn Ser Tyr Gly Leu Tyr Thr Ile Arg Asp Arg Glu Asn Arg Thr Ser
 405 410 415
 Leu Glu Leu Cys Trp Phe Arg Glu Gly Thr Thr Met Tyr Ala Leu Tyr
 420 425 430
 Ile Thr Val His Gly Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Leu Phe Gly Met Val
 435 440 445
 Val Leu Ala Leu Val Val Trp Lys Ile Phe Thr Leu Ser Arg Ala Thr
 450 455 460
 Ala Val Lys Glu Arg Gly Lys Asn Arg Lys Lys Val Leu Thr Leu Leu
 465 470 475 480
 Gly Leu Ser Ser Leu Val Gly Val Thr Trp Gly Leu Ala Ile Phe Thr
 485 490 495
 Pro Leu Gly Leu Ser Thr Val Tyr Ile Phe Ala Leu Phe Asn Ser Leu
 500 505 510
 Gln Gly Val Phe Ile Cys Cys Trp Phe Thr Ile Leu Tyr Leu Pro Ser
 515 520 525
 Gln Ser Thr Thr Val Ser Ser Ser Thr Ala Arg Leu Asp Gln Ala His
 530 535 540
 Ser Ala Ser Gln Glu
 545

<210> 3

<211> 1696

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (47)..(1693)

<400> 3

ggccagacag ccacagagct cctggcgtgg gcaaggctgg ccaagg atg gcg acg 55
 Met Ala Thr
 1
 ccc agg ggc ctg ggg gcc ctg ctc ctg ctc ctc ctg ctc ccg acc tca 103
 Pro Arg Gly Leu Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Thr Ser
 5 10 15
 ggt cag gaa aag ccc acc gaa ggg cca aga aac acc tgc ctg ggg agc 151
 Gly Gln Glu Lys Pro Thr Glu Gly Pro Arg Asn Thr Cys Leu Gly Ser
 20 25 30 35
 aac aac atg tac gac atc ttc aac ttg aat gac aag gct ttg tgc ttc 199
 Asn Asn Met Tyr Asp Ile Phe Asn Leu Asn Asp Lys Ala Leu Cys Phe
 40 45 50
 acc aag tgc agg cag tgc ggc agc gac tcc tgc aat gtg gaa aac ttg 247
 Thr Lys Cys Arg Gln Ser Gly Ser Asp Ser Cys Asn Val Glu Asn Leu
 55 60 65
 cag aga tac tgg cta aac tac gag gcc cat ctg atg aag gaa ggt ttg 295

31	32
Gln Arg Tyr Trp Leu Asn Tyr Glu Ala His Leu Met Lys Glu Gly Leu	
70 75 80	
acg cag aag gtg aac acg cct ttc ctg aag gct ttg gtc cag aac ctc	343
Thr Gln Lys Val Asn Thr Pro Phe Leu Lys Ala Leu Val Gln Asn Leu	
85 90 95	
agc acc aac act gca gaa gac ttc tat ttc tct ctg gag ccc tct cag	391
Ser Thr Asn Thr Ala Glu Asp Phe Tyr Phe Ser Leu Glu Pro Ser Gln	
100 105 110 115	
gtt ccg agg cag gtg atg aag gac gag gac aag ccc cct gac aga gtg	439
Val Pro Arg Gln Val Met Lys Asp Glu Asp Lys Pro Pro Asp Arg Val	
120 125 130	
cga ctt ccc aag agc ctt ttt cga tcc ctg cca ggc aac agg tct gtg	487
Arg Leu Pro Lys Ser Leu Phe Arg Ser Leu Pro Gly Asn Arg Ser Val	
135 140 145	
gtc cgc ttg gcc gtc acc att ctg gac att ggt cca ggg act ctc ttc	535
Val Arg Leu Ala Val Thr Ile Leu Asp Ile Gly Pro Gly Thr Leu Phe	
150 155 160	
aag ggc ccc cgg ctc ggc ctg gga gat ggc agc ggc gtg ttg aac aat	583
Lys Gly Pro Arg Leu Gly Leu Gly Asp Gly Ser Gly Val Leu Asn Asn	
165 170 175	
cgc ctg gtg ggt ttg agt gtg gga caa atg cat gtc acc aag ctg gct	631
Arg Leu Val Gly Leu Ser Val Gly Gln Met His Val Thr Lys Leu Ala	
180 185 190 195	
gag cct ctg gag atc gtc ttc tct cac cag cga ccg ccc cct aac atg	679
Glu Pro Leu Glu Ile Val Phe Ser His Gln Arg Pro Pro Pro Asn Met	
200 205 210	
acc ctc acc tgt gta ttc tgg gat gtg act aaa ggc acc act gga gac	727
Thr Leu Thr Cys Val Phe Trp Asp Val Thr Lys Gly Thr Thr Gly Asp	
215 220 225	
tgg tct tct gag ggc tgc tcc acg gag gtc aga cct gag ggg acc gtg	775
Trp Ser Ser Glu Gly Cys Ser Thr Glu Val Arg Pro Glu Gly Thr Val	
230 235 240	
tgc tgc tgt gac cac ctg acc ttt ttc gcc ctg ctc ctg aga ccc acc	823
Cys Cys Cys Asp His Leu Thr Phe Phe Ala Leu Leu Leu Arg Pro Thr	
245 250 255	
ttg gac cag tcc acg gtg cat atc ctc aca cgc atc tcc cag gcg ggc	871
Leu Asp Gln Ser Thr Val His Ile Leu Thr Arg Ile Ser Gln Ala Gly	
260 265 270 275	
tgt ggg gtc tcc atg atc ttc ctg gcc ttc acc att att ctt tat gcc	919
Cys Gly Val Ser Met Ile Phe Leu Ala Phe Thr Ile Ile Leu Tyr Ala	
280 285 290	
ttt ctg agg ctt tcc cgg gag agg ttc aag tca gaa gat gcc cca aag	967
Phe Leu Arg Leu Ser Arg Glu Arg Phe Lys Ser Glu Asp Ala Pro Lys	
295 300 305	
atc cac gtg gcc ctg ggt ggc agc ctg ttc ctc ctg aat ctg gcc ttc	1015
Ile His Val Ala Leu Gly Gly Ser Leu Phe Leu Leu Asn Leu Ala Phe	
310 315 320	
ttg gtc aat gtg ggg agt ggc tca aag ggg tct gat gct gcc tgc tgg	1063
Leu Val Asn Val Gly Ser Gly Ser Lys Gly Ser Asp Ala Ala Cys Trp	
325 330 335	

33

34

```

gcc cgg ggg gct gtc ttc cac tac ttc ctg ctc tgt gcc ttc acc tgg 1111
Ala Arg Gly Ala Val Phe His Tyr Phe Leu Leu Cys Ala Phe Thr Trp
340          345          350          355
atg ggc ctt gaa gcc ttc cac ctc tac ctg ctc gct gtc agg gtc ttc 1159
Met Gly Leu Glu Ala Phe His Leu Tyr Leu Leu Ala Val Arg Val Phe
          360          365          370
aac acc tac ttc ggg cac tac ttc ctg aag ctg agc ctg gtg ggc tgg 1207
Asn Thr Tyr Phe Gly His Tyr Phe Leu Lys Leu Ser Leu Val Gly Trp
          375          380          385
ggc ctg ccc gcc ctg atg gtc atc ggc act ggg agt gcc aac agc tac 1255
Gly Leu Pro Ala Leu Met Val Ile Gly Thr Gly Ser Ala Asn Ser Tyr
          390          395          400
ggc ctc tac acc atc cgt gat agg gag aac cgc acc tct ctg gag cta 1303
Gly Leu Tyr Thr Ile Arg Asp Arg Glu Asn Arg Thr Ser Leu Glu Leu
          405          410          415
tgc tgg ttc cgt gaa ggg aca acc atg tac gcc ctc tat atc acc gtc 1351
Cys Trp Phe Arg Glu Gly Thr Thr Met Tyr Ala Leu Tyr Ile Thr Val
          420          425          430          435
cac ggc tac ttc ctc atc acc ttc ctc ttt ggc atg gtg gtc ctg gcc 1399
His Gly Tyr Phe Leu Ile Thr Phe Leu Phe Gly Met Val Val Leu Ala
          440          445          450
ctg gtg gtc tgg aag atc ttc acc ctg tcc cgt gct aca gcg gtc aag 1447
Leu Val Val Trp Lys Ile Phe Thr Leu Ser Arg Ala Thr Ala Val Lys
          455          460          465
gag cgg ggg aag aac cgg aag aag gtg ctc acc ctg ctg ggc ctc tcg 1495
Glu Arg Gly Lys Asn Arg Lys Lys Val Leu Thr Leu Leu Gly Leu Ser
          470          475          480
agc ctg gtg ggt gtg aca tgg ggg ttg gcc atc ttc acc ccg ttg ggc 1543
Ser Leu Val Gly Val Thr Trp Gly Leu Ala Ile Phe Thr Pro Leu Gly
          485          490          495
ctc tcc acc gtc tac atc ttt gca ctt ttc aac tcc ttg caa ggt gtc 1591
Leu Ser Thr Val Tyr Ile Phe Ala Leu Phe Asn Ser Leu Gln Gly Val
          500          505          510          515
ttc atc tgc tgc tgg ttc acc atc ctt tac ctc cca agt cag agc acc 1639
Phe Ile Cys Cys Trp Phe Thr Ile Leu Tyr Leu Pro Ser Gln Ser Thr
          520          525          530
aca gtc tcc tcc tct act gca aga ttg gac cag gcc cac tcc gca tct 1687
Thr Val Ser Ser Ser Thr Ala Arg Leu Asp Gln Ala His Ser Ala Ser
          535          540          545
caa gaa tag 1696
Gln Glu

```

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 4

atggcgacgc ccaggggcct

20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
 <400> 5
 ttcttgagat gcggagtggg

20

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
 <400> 6
 acttctgct ctgtgccttc a

21

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA
 <400> 7
 gcaaagatgt agacggtgga g

21

【配列表フリーテキスト】配列番号4：合成DNA

配列番号5：合成DNA

配列番号6：合成DNA

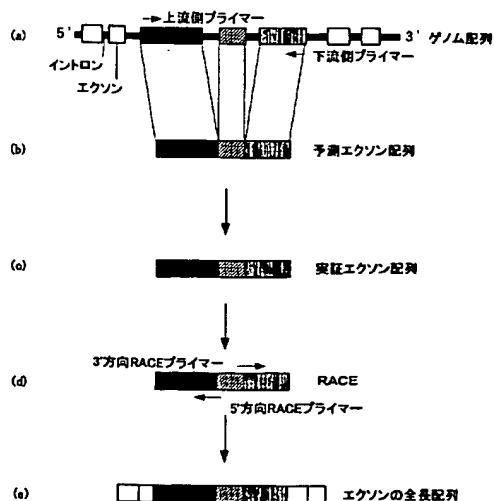
配列番号7：合成DNA

【図面の簡単な説明】

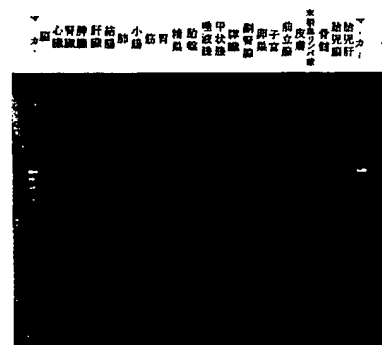
【図1】 VTSアプローチによる新規遺伝子クローニングの概要を示す図である。

30 【図2】 各種臓器由来のRNAを鋳型として用いた場合のRT-PCRの結果を示した写真である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K	14/705	C 0 7 K	16/28
	16/28	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/15		1/19
	1/19		1/21
	1/21	C 1 2 P	21/02
	5/10	C 1 2 Q	1/68
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15
C 1 2 Q	1/68		33/50
G 0 1 N	33/15		33/53
	33/50		
	33/53		33/566
		C 1 2 N	15/00
	33/566		5/00